

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Jc971 U.S. PTO  
09/912559



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 100 36 641.4  
Anmeldetag: 26. Juli 2000  
Anmelder/Inhaber: Aventis Behring GmbH,  
Marburg/DE  
Bezeichnung: Monoklonale Antikörper für die den Blutgerinnungs-  
faktor VII aktivierende Protease (FSAP) und ihre  
Verwendung  
IPC: C 07 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. März 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

W. Maier

AVENTIS BEHRING GMBH  
ANR 8177007

2000/A008 – A7  
Dr. Pfe / vm

**Monoklonale Antikörper für die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease (FSAP) und ihre Verwendung**

Gegenstand der Erfindung sind monoklonale Antikörper gegen die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease und ihre Verwendung als Immunabsorbens zur Reinigung, zum Nachweis und zur Bestimmung der Aktivität der genannten Protease (FSAP).

Seit 1996 ist eine im Plasma vorkommende Protease bekannt, die aufgrund ihrer Eigenschaft, an Hyaluronsäure zu binden, als Plasma Hyaluronean Binding Protein, (=PHBP), bezeichnet wurde (Choi-Miura et al., J. Biochem. 1996; 119:1157-65). Diese Protease wurde kurz danach auch in Prothrombin-Konzentraten nachgewiesen und daraus isoliert (Hunfeld et al., Ann. Hematol. 1998; 76:A101; Hunfeld et al., FEBS Letters, 1999; 456:290-94). Eine mögliche biologische Funktion konnte bis dahin allerdings nicht beschrieben werden. Diese wurde erstmals 1999 mitgeteilt (Römisich et al., Ann. Hematol. 1999; 78:A101; Römisich et al., Ann. Hematol. 1999; 78:A24; Römisich et al. Blood Coagul Fibrinol., 1999; 10:471-79; Römisich et al.; Haemostasis 1999; 29:292-99). In in vitro Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Protease den Gerinnungsfaktor VII und die Einketten-Plasminogenaktivatoren aktivieren kann. Dagegen werden die Blutgerinnungsfaktoren V und VIII proteolytisch degradiert (Deutsche Patentanmeldung 199 03 693.4). Entsprechend dem Erstbefund wurde die Protease **Faktor Sieben Aktivierende Protease** oder **FSAP** genannt.

Neuere Ergebnisse haben bestätigt, dass FSAP tatsächlich ein Plasmaprotein ist. Als potentiell in die Regulation der Hämostase, vor allem in Gerinnungs- und Fibrinolysereaktionen eingreifendes Enzym, ist nicht nur dessen Herstellung und Charakterisierung von Interesse, sondern auch die Quantifizierung von Blutplasma-Konzentrationen in gesunden Personen und Patienten. Außerdem könnten FSAP-Konzentrationen in anderen Körperflüssigkeiten oder Zellextrakten Informationen über potentielle Krankheitszustände geben. Entsprechende Testsysteme, die die Quantifizierung sowohl des FSAP-Antigengehaltes als auch die Bestimmung seiner Aktivität ermöglichen, wie Western Blots oder ein Enzym-Immunoassay (ELISA), wurden bereits beschrieben (Deutsche Patentanmeldungen 199 03 693.4 und 199 26 531.3).

Diese Testsysteme basieren darauf, dass FSAP durch spezifische monoklonale Antikörper gebunden und/oder detektiert wird. Obwohl bei der Immunisierung bspw. von Mäusen häufig viele positive Klone bezüglich der Expression eines spezifischen monoklonalen Antikörpers identifiziert werden, sind doch nicht selten nur wenige davon für die vorstehend genannten Fragestellungen geeignet. Es stellt sich deshalb die Aufgabe, spezifische monoklonale Antikörper gegen die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease aufzufinden, die sowohl für ihre Reindarstellung, als auch für ihren qualitativen und quantitativen Nachweis als auch für ihre Aktivitätsbestimmung effektiv einsetzbar sind.

Es wurde nun gefunden, dass diesen Anforderungen in hohem Maße monoklonale Antikörper gegen die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease gerecht werden, die von der Hybridomazelllinie DSM ACC2453 und der Hybridomazelllinie DSM ACC2454 gebildet werden.

Bis vor kurzem wurde FSAP überwiegend in ihrer aktivierte Form gereinigt. Konventionelle Präparationsmethoden, wie säulenchromatografische Techniken, begünstigten die rasche Aktivierung und anschließende Inaktivierung der Protease.

Erfindungsgemäß ist nun die Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease und vor allem ihres Proenzymes mit hoher Ausbeute dadurch möglich, dass man einen der vorstehend genannten Antikörper an einen Träger koppelt, diesen mit einer die Protease oder ihre Proenzym enthaltenden Flüssigkeit equilibriert, anschließend auswäscht und dann die Protease oder ihr Proenzym durch Elution gewinnt.

Darüber hinaus eignen sich die genannten Antikörper auch zum Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzymes mit einem Immunoassay, bei dem man

- a) eine Probe, die die Protease oder ihr Proenzym enthalten soll, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten erfindungsgemäßen Antikörper inkubiert und auswäscht, dann einen zweiten markierten erfindungsgemäßen Antikörper zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper oder anderen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern hervorgerufene Signal misst; oder
- b) auf einem Träger die in der zu untersuchenden Probe enthaltene Protease oder ihr Proenzym fixiert, beispielsweise durch polyklonale Antikörper gegen die Protease oder ihr Proenzym, und sie mit einem markierten erfindungsgemäßen Antikörper allein oder in Mischung oder mit einem unmarkierten der erfindungsgemäßen Antikörper und anschließendem Nachweis des monoklonalen Antikörpers detektiert oder
- c) einen auf einem Träger fixierten erfindungsgemäßen Antikörper mit einer auf die Protease oder ihr Proenzym zu untersuchenden Probe in Gegenwart einer markierten Protease oder ihres Proenzymes versetzt und das durch die Markierung hervorgerufene Signal misst.

Eine andere Möglichkeit zum Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzyms besteht darin, dass man den Nachweis mit der Western Blot-Methodik durch eine immunologische Reaktion mit einem markierten erfindungsgemäßen Antikörper allein oder in Mischung oder mit einem unmarkierten der erfindungsgemäßen Antikörper und anschließendem Nachweis des monoklonalen Antikörpers, z.B. durch markiertes Protein A oder G oder einen markierten, gegen den monoklonalen Antikörper gerichteten monoklonalen oder polyklonalen Antikörper durchführt.

Schließlich ist es auch möglich, die Aktivität der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzyms in Proteinlösungen dadurch zu bestimmen, dadurch dass man die die Protease und/oder ihr Proenzym enthaltende Proteinlösung an einem festen Träger inkubiert, an die zuvor ein gegen die Protease gerichteter monoklonaler erfindungsgemäßer Antikörper gekoppelt wurde und nach Auswaschen des festen Trägers die daran fixierte Protease und ihr Proenzym mit Reagentien inkubiert, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben. Die Aktivität der Protease oder ihres Proenzyms kann dann durch eine photometrische Bestimmung der bei der Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion gemessen werden.

Andere Möglichkeiten zur Bestimmung der Aktivität der Protease oder ihres Proteins bestehen darin, dass man

- ihre die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va aktivierende Wirkung oder
- ihre die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder
- ihre Plasminogenaktivatoren aktivierende Wirkung oder

- ihre den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Wirkung misst.

Für die Anwendung in den vorstehend genannten Verfahren eignen sich sowohl die vollständigen monoklonalen Antikörper als auch deren Fragmente wie F(ab)<sub>2</sub> oder F(ab). Die Antikörper oder ihre Fragmente werden nach Markierung mit einer radioaktiven oder fluoreszierenden oder enzymatisch aktiven Substanz als detektierende Hilfsmittel in einem Immunoassay oder in einem Western Blot-Nachweisverfahren eingesetzt. Die unmarkierten monoklonalen Antikörper oder Fragmente können ebenfalls eingesetzt werden, jedoch wird dann die Detektion oder Immobilisierung z.B. durch einen gegen den Maus-Antikörper gerichteten markierten Antikörper oder sein markiertes Fragment durchgeführt (Sandwich-Verfahren). Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper oder ihre Fragmente können allein oder als Mischung eingesetzt werden. Dies ist besonders empfehlenswert bei Western Blots, da SDS-Gelelektrophoresen häufig unter reduzierenden Bedingungen der Proben durchgeführt werden. Da die beiden Polypeptidketten der FSAP lediglich über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind, zerfällt das Molekül bei der Reduktion in zwei Ketten, nämlich in die schwere und die leichte Kette, wobei die erstere vom monoklonalen Antikörper der DSM ACC2454 und die letztere vom monoklonalen Antikörper der DSM ACC2453 erkannt wird. Zur Detektion beider Ketten sind also die beiden erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper oder ihre Fragmente erforderlich.

Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper wurden wie folgt hergestellt und charakterisiert:

#### Immunisierung

Drei weibliche Balb/c-Mäuse (ca. 6 Wochen alt) wurden mit FVIII-aktivator immunisiert. Die erste Injektion bestand aus 0,2 ml des Antigens (10 µg) gemischt mit 0,2 ml kompl. Freund's Adjuvans. In den drei folgenden Boost-Injektionen (Abstand jeweils 2 Wochen) wurde das Antigen (20 µg in 0,2 ml) ohne Adjuvans verabreicht

(alle Injektionen i.p.). Die Verdünnung des Immunogens erfolgte in PBS. Nach der letzten Injektion wurden die Serum-Titer mittels indirektem ELISA bestimmt, indem eine Mikrotiterplatte mit FVII-Aktivator beschichtet wurde. Für die Fusion wurde die Maus mit dem höchsten Serum-Titer ausgewählt.

Fusion

T  
Type 2

Etwa drei Wochen nach der letzten Applikation wurde das Antigen an drei aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht (10 µg in 0,1 ml i.v.). Am nächsten Tag (Tag 4) wurde die Maus nach einer Blutentnahme getötet, die Milz entnommen und die Milzzellen isoliert. Die Milzzellen wurden anschließend mit der murinen Myelom-Zelllinie SP2/0-Ag 14 fusioniert. Als Fusionsreagenz wurde Polyethyenglykol 4000 (Merck) verwendet. Die Fusion wurde mit einer Modifikation der Original Köhler/Milstein-Methode durchgeführt. Die Zellen wurden auf 24 Well-Kulturplatten verteilt. Als Medium wurde Dulbecco mod. Eagle's Medium mit 10% fötalem Kälberserum und HAT zur Selektion eingesetzt. Nach etwa zwei Wochen wurden die gewachsenen Zellclone in die Vertiefungen einer 48 Well-Platte transferiert und kodiert.

Hybridoma-Screening

Von 1728 gewachsenen Clonen wurde der Kulturüberstand genommen und mittels ELISA auf Anwesenheit von Maus IgG getestet. Mit Hilfe von immobilisiertem FVII-Aktivator wurden Maus IgG positive Überstände auf Spezifität geprüft (ELISA). Von den getesteten Zelllinien wurden 108 Zelllinien als spezifisch für FVII-Aktivator identifiziert und kryokonserviert.

Die zwei Hybridoma-Zelllinien mit den Bezeichnungen DSM ACC2453 und DSM ACC2454 wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Spezifität der von diesen Zelllinien gebildeten Antikörper wurde mit dem BIACORE bestätigt und die

Bindungskinetik untersucht. Die beiden monoklonalen Antikörper sind vom Typ des IgG1.

AVENTIS BEHRING GMBH  
ANR 8177007

2000/A008 – A7  
Dr. Pfe / vm

Patentansprüche:

1. Monoklonale Antikörper gegen die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie von der Hybridoma-Zelllinie DSM ACC2453 oder der Hybridoma-Zelllinie DSM ACC2454, gebildet werden.
2. Verfahren zur Reindarstellung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzymes, **dadurch gekennzeichnet**, dass man die monoklonalen Antikörper von Anspruch 1 allein oder in Mischung an einen Träger koppelt, diesen mit einer die Protease oder ihr Proenzym enthaltenden Flüssigkeit equilibriert, anschließend auswäscht und dann die Protease oder ihr Proenzym durch Elution gewinnt.
3. Verfahren zum Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzymes mit einem Immunoassay, **dadurch gekennzeichnet**, dass man
  - a) eine Probe, die die Protease oder ihr Proenzym enthalten soll, mit einem auf einem festen Träger fixierten ersten Antikörper von Anspruch 1 allein oder in Mischung inkubiert und auswäscht, dann einen zweiten, markierten Antikörper zugibt und abermals auswäscht und das vom zweiten Antikörper oder anderen monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern hervorgerufene Signal misst oder

- b) auf einem Träger die in der zu untersuchenden Probe enthaltene Protease oder ihr Proenzym fixiert und sie mit einem markierten Antikörper von Anspruch 1 allein oder in Mischung oder mit einem unmarkierten der erfindungsgemäßen Antikörper und anschließendem Nachweis des monoklonalen Antikörpers detektiert oder
- c) einen auf einem Träger fixierten Antikörper von Anspruch 1 allein oder in Mischung mit einer auf die Protease oder ihr Proenzym zu untersuchenden Probe in Gegenwart einer markierten Protease oder ihres Proenzyms versetzt und das durch die Markierung hervorgerufene Signal misst.

4. Verfahren zum Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzmys, **dadurch gekennzeichnet**, dass man den Nachweis mit der Western Blot Methodik durch eine immunologische Reaktion mit einem markierten Antikörper von Anspruch 1 allein oder in Mischung oder mit einem unmarkierten der erfindungsgemäßen Antikörper und anschließendem Nachweis des monoklonalen Antikörpers durchführt.

5. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzmys in Proteinlösungen, **dadurch gekennzeichnet**, dass man

- die die Protease und/oder ihr Proenzym enthaltende Proteinlösung an einem festen Träger inkubiert, an die zuvor ein gegen die Protease gerichteter monoklonaler Antikörper von Anspruch 1 allein oder in Mischung gekoppelt wurde und
- nach Auswaschen des festen Trägers die daran fixierte Protease und/oder ihr Proenzym mit Reagentien inkubiert, die deren Aktivitätsbestimmung erlauben.

6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivität der Protease oder ihres Proenzymes durch eine photometrische Bestimmung der Einwirkung auf chromogene Substrate auftretenden Extinktion gemessen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Aktivität der Protease oder ihres Proenzymes gemessen wird durch

- ihre die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierende Wirkung oder
- ihre die Blutgerinnungszeiten verkürzende Wirkung in globalen Gerinnungstests oder
- ihre Plasminogen-Aktivatoren aktivierende Wirkung oder
- ihre den FVII aktivierende Wirkung.

8. Verfahren nach den Ansprüchen 5 und 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass der gegen die Protease oder sein Proenzym gerichtete Antikörper ein F(ab)- oder ein F(ab)<sub>2</sub>-Fragment eines Antikörpers von Anspruch 1 ist.

9. Verwendung eines monoklonalen Antikörpers von Anspruch 1 oder seines F(ab)- oder F(ab)<sub>2</sub>-Fragments als Immunadsorbens zur Reinigung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease (=FSAP) oder ihres Proenzymes.

Zusammenfassung:

**Monoklonaler Antikörper für die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease (FSAP) und ihre Verwendung**

Es werden monoklonale Antikörper gegen die den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierende Protease beschrieben, die von der Hybridoma-Zelllinie DSM ACC2453 oder der Hybridoma-Zelllinie DSM ACC2454 gebildet werden. Sie können zur Reindarstellung, zum Nachweis und zur Aktivitätsbestimmung der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease oder ihres Proenzymes eingesetzt werden.